# 米曲霉来源α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 在毕赤酵母中的表达及其对豆浆中大豆寡糖的酶解效果

郭昱含　杨勇智　郭贺楠　王　剑　曹云鹤*

（中国农业大学动物科学技术学院，动物营养学国家重点实验室，北京 100193）

摘　要：本试验旨在研究米曲霉来源α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 在毕赤酵母中的表达及其对豆浆中大豆寡糖的酶解效果。以 NCBI 数据库中米曲霉来源α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 的 mRNA 序列（GenBank 登录号：XP_001817311.1）为依据，利用 PCR 扩增得到 *gal A* 基因并根据毕赤酵母使用密码子的偏好性优化基因序列，构建野生型和优化型毕赤酵母工程菌株，摇瓶发酵 120 h，测定酶学性质。设置 25 和 45 ℃2 个温度，每个温度下各设置 0.6、1.2 和 2.4 U 3 个加酶量，用发酵得到的α-半乳糖苷酶酶解 10 mL 豆浆中的大豆寡糖。结果显示：该α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 全长 1 605 bp，不含内含子，编码 534 个氨基酸，诱导 120 h 后优化型工程菌株的α-半乳糖苷酶活性为 1.952 U/mL，比野生型工程菌株提高了 285%。发酵得到的α-半乳糖苷酶的最适 pH 为 4.33，最适温度为 55 ℃；在 pH 3.00~8.00 间稳定性良好，在 55 ℃条件下保持 40 min 后残余α-半乳糖苷酶相对活性为 60%；该酶对大部分金属离子具有抗性，但其被 $MnSO_4$ 抑制；以 *p*NPG 为底物时的酶动力学参数米氏常数（*Km*）为 0.024 3 mol/L，最大反应速度（$V_{max}$）为 $1.0\times10^{-7}$ mol/(L·s)。酶解试验结果显示，45 ℃下加酶量为 2.4 U 反应 12 h 后，大豆寡糖中棉籽糖的降解率为 50.0%，水苏糖的降解率为 31.9%。由此可见，本试验中生产的α-半乳糖苷酶对豆浆中的大豆寡糖有一定的降解作用。

关键词：米曲霉；α-半乳糖苷酶；密码子优化；毕赤酵母；大豆寡糖

中图分类号：Q786　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

大豆、大豆产品及大豆加工副产品是人及动物重要的蛋白质来源，在食品和饲料领域有着广泛的应用。大豆中含有多种抗营养因子如胰蛋白酶抑制剂、植酸、单宁和大豆寡糖等[1-2]，其中大豆寡糖中的棉籽糖和水苏糖等α-半乳糖苷类寡糖，由于人和单胃动物体内缺少相应的水解酶α-半乳糖苷酶(α-galactosidase,EC 3.2.1.22)，这些寡糖只能在后肠段被微生物发酵，这一过程中会产生 $CO_2$ 和甲烷等气体，造成胀气、腹痛、恶心和腹泻等胃肠不适，影响营养物质的消化吸收，对人体健康和动物的生产性能造成负面影响。用α-半乳糖苷酶酶解是消除大豆寡糖抗营养因子的常用方法之一。

收稿日期：2018-04-13
基金项目："十二五"国家科技支撑计划项目（2013BAD10B01）
作者简介：郭昱含（1992-），女，辽宁沈阳人，硕士研究生，研究方向为猪营养与饲料科学。E-mail: yhbess@163.com
*通信作者：曹云鹤，副研究员，博士生导师，E-mail: caoyh@cau.edu.cn

α-半乳糖苷酶又称蜜二糖酶，是一种外切糖苷酶，能特异性水解α-半乳糖苷末端非还原性的α-1,6-半乳糖残基，其可作用于含半乳糖的低聚寡糖如蜜二糖、棉籽糖、水苏糖和毛蕊花糖等，还可以作用于含半乳糖的多聚糖如半乳甘露聚糖和半乳糖脂等。α-半乳糖苷酶分布广泛，咖啡豆等豆科植物的种子、番茄和烟草中均可分离得到α-半乳糖苷酶[3-5]，嗜热细菌HB27、巨大芽孢杆菌、热解纤维素菌、脆弱类杆菌、假交替单胞菌和天蓝色链霉菌等细菌[6-11]，尖孢镰刀菌、双孢蘑菇、榆黄蘑和里氏木霉等真菌[12-15]以及人和鼠等哺乳动物[16-17]中也能分离得到α-半乳糖苷酶。

α-半乳糖苷酶在医疗、饲料、食品和造纸等行业都有广泛的应用。在医疗领域中，α-半乳糖苷酶在法布里病的治疗、血型转换和异种器官的移植方面有重要应用，Alcalay 等[18]的研究结果显示α-半乳糖苷酶 A 与帕金森病有关联。在饲料领域，外源添加α-半乳糖苷酶能够有助于消除豆粕等饲料原料中大豆寡糖的抗营养作用，提高猪和家禽的生产性能，降低饲料成本[19-22]。在食品领域，α-半乳糖苷酶除了可以消除豆浆和豆奶中的大豆寡糖，还在制糖工业中有重要应用，能够消除棉籽糖对蔗糖的妨碍作用，提高蔗糖得率[23]。此外，在造纸生产中组合使用α-半乳糖苷酶与木聚糖酶可以增强漂白效果[24]，α-半乳糖苷酶能够与环糊精相互作用，生成的α-半乳糖-环糊精在一些重要的保健食品中有应用潜力。

米曲霉是粮食食品酿造和酿酒的主要菌种之一，在药品制备、工业酶制剂和饲料生产上均有重要而广泛的应用，被美国食品药品监督管理局列为公认安全的生物体(generally recognized as safe,GRAS)，可以发酵产生天门冬氨酰氨基肽酶、β-半乳糖苷酶、蛋白酶和角质酶等多种酶[25-28]。

本试验组前期从北京市通州区的土壤中分离得到了 1 株产α-半乳糖苷酶的米曲霉，本试验克隆了该米曲霉来源的α-半乳糖苷酶基因 *gal A*，依据毕赤酵母使用密码子的偏好性进行基因序列的优化，构建毕赤酵母工程菌株，摇瓶诱导表达研究其酶学性质，并验证该酶对豆

浆中大豆寡糖的酶解效果。

# 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

### 1.1.1 菌株和载体

大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)Top 10 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司，大肠杆菌克隆载体 pGM-T、毕赤酵母表达载体 pPICZαA、毕赤酵母 X-33 菌株均为本实验室保存，米曲霉是从北京市通州区的土壤中分离得到（经过 18S rRNA 序列鉴定）。

### 1.1.2 工具酶及主要试剂

Phusion DNA 聚合酶、*Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ购自 New England Biolabs 公司，Zeocin 购自 Invitrogen 公司，dNTPs 和 *Sac* Ⅰ购自 TaKaRa 公司，对硝基苯基-α-*D*-吡喃半乳糖苷(*p*NPG)购自 Solarbio 公司，琼脂糖凝胶回收试剂盒、真菌基因组 DNA 提取试剂盒、酵母基因组 DNA 提取试剂盒和高纯质粒小量制备试剂盒购自 Omega 公司，棉籽糖和蔗糖购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司，半乳糖和水苏糖购自北京百灵威科技有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 米曲霉来源α-半乳糖苷酶基因的克隆与分析

以 NCBI 数据库中公开的米曲霉来源α-半乳糖苷酶基因 A 的 mRNA 序列（GenBank 登录号：XP_001817311.1）为依据，设计 1 对特异性引物 galA-F（5′-ATGCGACTTATCACAAGATGGATACCGCTA-3′）和 galA-R（5′-TTACAATGCGACATGGACACCAGCGGGTAA-3′），以米曲霉总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 的反应条件为：98 ℃ 5 min；98 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 2.5 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。反应结束后，取 PCR 产物 5 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增效果。将回收后的基因片段与载体 pGM-T 于 16 ℃连接过夜后，转入大肠杆菌 Top 10 感受态细胞，重组质粒 pGM-T-*gal A* 送至北京梓熙生物科技有限公司进行测序验证，测序引

物为 *gal A*-F 和 *gal A*-R。序列结果用 BioEdit 软件进行分析。

1.2.2 α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 毕赤酵母表达菌株的构建

以 pGM-T-galA 为模板，以 *Eco*R Ⅰ-*gal A*-F 和 *Not* Ⅰ-*gal A*-R 为引物，扩增质粒中的 *gal A* 基因。引物序列如下：*Eco*R Ⅰ-*gal A*-F，5′-CCGGAATTCATGCGACTTATCACAAG-3′（下划线为 *Eco*R Ⅰ酶切位点），*Not* Ⅰ-*gal A*-R，5′-ATTTGCGGCCGCTTACAATGCGACATG-3′（下划线为 *Not* Ⅰ酶切位点）。PCR 的反应条件同 1. 2. 1。用限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ对 PCR 产物和载体 pPICZαA 进行双酶切，置于 37 ℃水浴酶切 12 h 后，将基因片段与载体于 16 ℃连接过夜，转入大肠杆菌 Top 10 感受态细胞。将重组表达质粒 pPIC-*gal A*-wt（wt 表示野生型，下同）送至北京梓熙生物科技有限公司进行测序验证，测序引物为 AOX-F 和 AOX-R，序列结果用 BioEdit 软件进行分析。

根据毕赤酵母使用密码子的偏好性，对使用频率低的密码子进行替换，优化 *gal A* 的基因序列。优化的合成和测序由北京梓熙生物科技有限公司完成。优化后的表达载体 pPIC-*gal A*-opt（opt 表示优化型，下同）的构建方法同上。

将重组表达质粒 pPIC-*gal A*-wt 和 pPIC-*gal A*-opt 用限制性内切酶 *Sac* Ⅰ线性化。37 ℃酶切过夜后电转入新配制的毕赤酵母 X-33 感受态细胞，电击完成后立即加入 1 mL 冰预冷的 1 mol/L 的山梨醇溶液，充分混匀后转移至 50 mL 离心管中，28 ℃培养 3 h。将菌体悬液涂布于 YPDS 固体培养基（含有 100 μg/mL Zeocin），28 ℃培养约 3 d，直至长出清晰的菌落。挑取单菌落划线至 YPD 固体培养基（含有 100 μg/mL Zeocin），28 ℃培养 3～4 d，至菌落清晰。

1.2.3 重组菌株的摇瓶发酵

挑取 X33/*gal A*-wt 和 X33/*gal A*-opt 单菌落，分别接种于 10 mL 的 YPD 液体培养基（含有 100 μg/mL Zeocin）中，250 r/min、28 ℃培养约 24 h，取 100 μL 的菌液至 50 mL 的 BMGY

液体培养基中，250 r/min、28 ℃培养至 600 nm 波长下吸光度（$OD_{600}$）达到 2.0，将全部 BMGY 液体培养基以 5 000 r/min、4 ℃离心 10 min, 弃掉上清，用 50 mL 的 BMMY 液体培养基重悬菌体，250 r/min、28 ℃培养。每 24 h 向培养液中加无水甲醇（终浓度 0.5%）进行诱导。120 h 后，将菌液于常温下 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，置于 4 ℃保存。

#### 1.2.4 α-半乳糖苷酶活性的测定

参照 Rezessy-Szabó等[29]的方法进行α-半乳糖苷酶活性的测定。配制浓度分别为 0、2、4、8、16、24、32 和 40 μmol/L 的对硝基苯酚标准梯度溶液，在 405 nm 波长下测定溶液的吸光度（$OD_{405}$）。以 $OD_{405}$ 为横坐标，以对硝基苯酚的浓度为纵坐标，绘制标准曲线。

取 100 μL 底物溶液 *p*NPG（10 mmol/L）与 100 μL 用 pH 4.33 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液适当稀释的酶液，55 ℃条件下反应 10 min，加入 800 μL 的 $Na_2CO_3$ 溶液（0.5 mol/L）终止反应，在 405 nm 波长下测定溶液的吸光度。α-半乳糖苷酶活性的定义为：在 55 ℃和 pH 4.33 的条件下，每分钟从浓度为 10 mmol/L 的 *p*NPG 底物溶液中释放 1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量为 1 个活性单位（U）。

#### 1.2.5 α-半乳糖苷酶的酶学性质分析

最适 pH：配制 pH 分别为 2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00 和 8.00 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液，用上述不同 pH 的缓冲液稀释酶液和配制 10 mmol/L 的 *p*NPG 底物溶液，在 55 ℃条件下测定α-半乳糖苷酶活性。

pH 稳定性：在室温下，将酶液分别在上述不同 pH 的缓冲液中预处理 30 min，最适条件下测定残余α-半乳糖苷酶活性。

最适温度：分别在 10、20、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 和 80 ℃下测定α-半乳糖苷酶活性，确定最适温度。

温度稳定性：将酶液分别置于 40 和 45 ℃保温 100 min，每 20 min 取样；分别置于 50 和 55 ℃保温 50 min，每 10 min 取样；置于 60 ℃保温 12 min，每 2 min 取样；置于 65 ℃保

温 10 min，每 2 min 取样；置于 70 ℃保温 5 min，每 1 min 取样。每个温度设置 1 个对照组，对照组的酶液置于 4 ℃保温，其余条件均与试验组相同。处理后在最适条件下测定α-半乳糖苷酶活性。

金属离子抗性：用最适 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制浓度为 20 mmol/L 的不同金属化合物[$CuSO_4$、KCl、$(NH_4)_2SO_4$、$MgCl_2$、$CaCl_2$、$ZnSO_4$、NaCl、$CoSO_4$、$NaNO_3$和 $MnSO_4$]溶液，将酶液与金属化合物溶液等体积混合，使金属离子终浓度为 10 mmol/L。以不添加金属离子的酶液作为空白对照。室温下处理 1 h 后在最适条件下测定α-半乳糖苷酶活性。

酶动力学参数：用最适 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制浓度分别为 1、10/9、5/4、10/7、5/3、2、5/2、10/3、5、10 和 20 mmol/L 的 *p*NPG 底物溶液。在最适条件下测定α-半乳糖苷酶活性。根据 Eadie-Hofstee 作图法测定米氏常数（*K*m）和最大反应速度（$V_{max}$）。

1.2.6　α-半乳糖苷酶对豆浆中大豆寡糖的体外酶解能力分析

将自制的 10%（质量体积分数）豆浆溶液以 10 000 r/min 离心 15 min 后取上清液，用 pH 4.33 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液调节 pH 为 5.00，作为反应液。取 10 mL 上述豆浆反应液于 15 mL 离心管中，按照以下条件设置进行试验。试验设置 6 个处理，分别是：1）加酶量 0.6 U，温度 25 ℃；2）加酶量 1.2 U，温度 25 ℃；3）加酶量 2.4 U，温度 25 ℃；4）加酶量 0.6 U，温度 45 ℃；5）加酶量 1.2 U，温度 45 ℃；6）加酶量 2.4 U，温度 45 ℃。每个处理设置 2 个平行 1 个对照，对照加入 2 mL 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液（pH 4.33）。在反应 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 h 时分别取样 500 μL，立即 100 ℃水浴 5 min，冷却至室温后 10 000 r/min 离心 10 min，用超纯水将上清液稀释 500 倍，过 0.10 μm 滤膜于接样瓶中，进行离子色谱，分析其半乳糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、棉籽糖和水苏糖含量的变化，并根据水苏糖和棉籽糖含量的变化计算降解率。

# 2　结果与分析

## 2.1　α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 的 PCR 扩增及序列比对分析

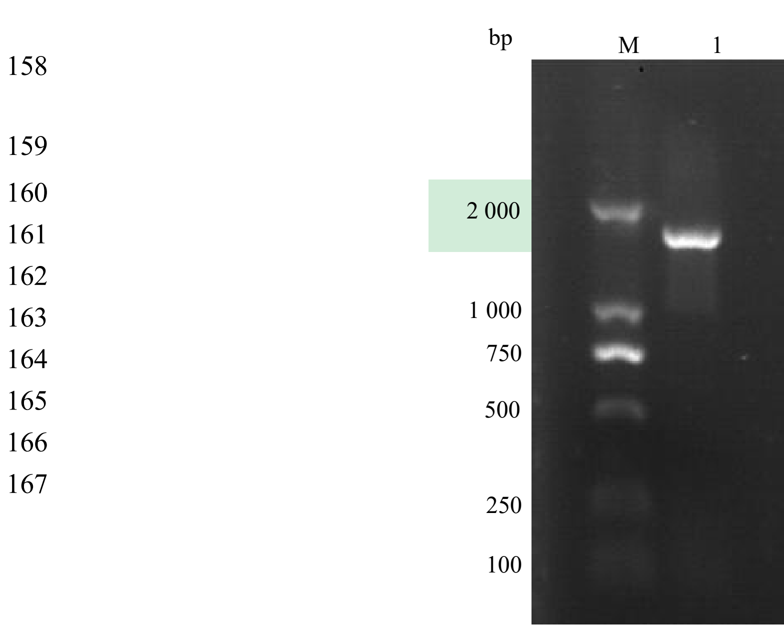
以提取的米曲霉总 DNA 为模板，用特异性引物 *gal A*-F 和 *gal A*-R 来进行 PCR 扩增，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，结果见图 1，在约 1 600 bp 处可见 1 条清晰的条带，与预期结果相符。

PCR 产物与大肠杆菌克隆载体 pGM-T 连接后转化到大肠杆菌 Top 10 感受态细胞，筛选出阳性克隆进行测序。序列分析结果表明，PCR 扩增得到的 DNA 片段为目的基因，基因全长 1 605 bp，不含内含子，编码 534 个氨基酸，包含 25 个氨基酸的信号肽，有 2 个天冬氨酸催化位点，预测蛋白质的等电点为 4.57（https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool），属于糖基水解酶 27（GH27）家族。

将该基因与 NCBI 上已知序列进行比对，结果如图 2。本试验中米曲霉来源的α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 与 2 种已报道的米曲霉来源的α-半乳糖苷酶基因（NCBI 参考序列：XP_001817311.1；GenBank 登录号：OOO13450.1）的序列一致性为 100%，但关于这 2 种酶的酶学性质并没有报道。

## 2.2 α-半乳糖苷酶基因序列的优化

根据毕赤酵母使用密码子的偏好性，以不改变氨基酸序列为前提，对去除信号肽的α-半乳糖苷酶基因序列进行优化，优化前后的序列比较见图 3，*gal A*-wt 与 *gal A*-opt 核苷酸序列的一致性为 76.68%。



M：DL-2000 分子量标准；1：α-半乳糖苷酶 *gal A* 基因 PCR 扩增产物。

M: DL-2000 DNA molecular weight marker; 1: PCR products of α-galactosidase *gal A* gene.

图 1　α-半乳糖苷酶基因 *gal A* 的 PCR 扩增结果

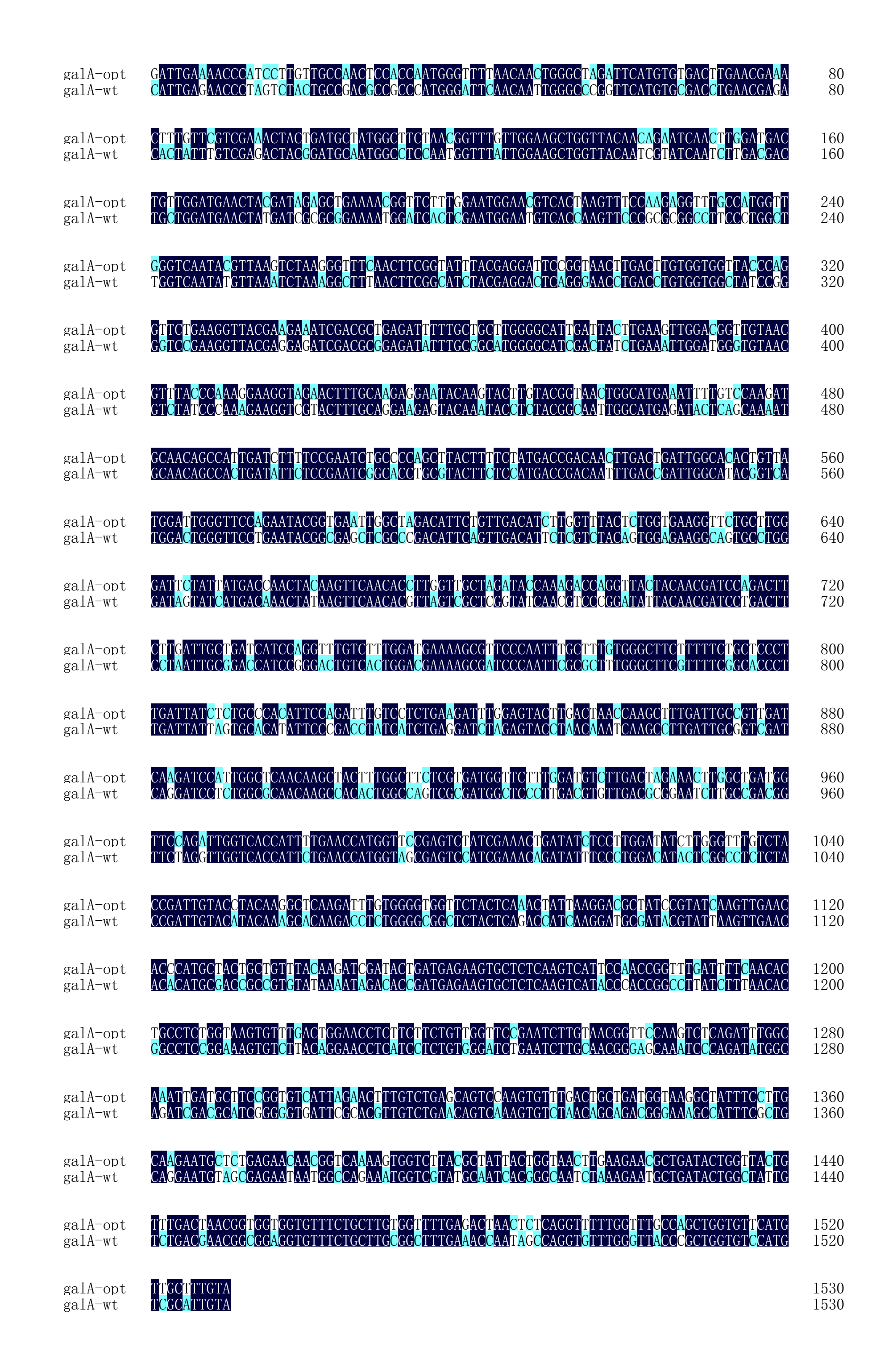
Fig.1　PCR result of α-galactosidase *gal A* gene



米曲霉 *Aspergillus oryzae*（GenBank 登录号：OOO13450.1）；米曲霉 RIB40 *Aspergillus oryzae* RIB40（NCBI 参考序列：XP_001817311.1）；黄曲霉 NRRL3357 *Aspergillus flavus* NRRL3357（NCBI 参考序列：XP_002372370.1）；黄曲霉 AF70 *Aspergillus flavus* AF70（GenBank 登录号：KOC13641.1）；寄生曲霉 SU-1 *Aspergillus parasiticus* SU-1（GenBank 登录号：KJK61669.1）；*Aspergillus arachidicola*（GenBank 登录号：PIG89641.1）；*Aspergillus bombycis*（NCBI 参考序列：XP_022394533.1）；黑曲霉 ATCC1015 *Aspergillus niger* ATCC1015（GenBank 登录号：EHA18663.1）；黑曲霉 *Aspergillus niger*（GenBank 登录号：SPB52066.1）；黑曲霉 *Aspergillus niger*（UniProtKB/Swiss-Prot：P28351.1）。

图 2　基于氨基酸序列的α-半乳糖苷酶的同源树

Fig.2　Homology tree based on amino acid sequences of α-galactosidase



深蓝色代表野生序列与优化序列一致部分。

Dark blue refers to the same parts between wild sequence and optimized sequence.

图 3　*gal A* 基因野生序列与优化序列的比较

Fig.3　Comparison of *gal A* gene between wild sequence and optimized sequence

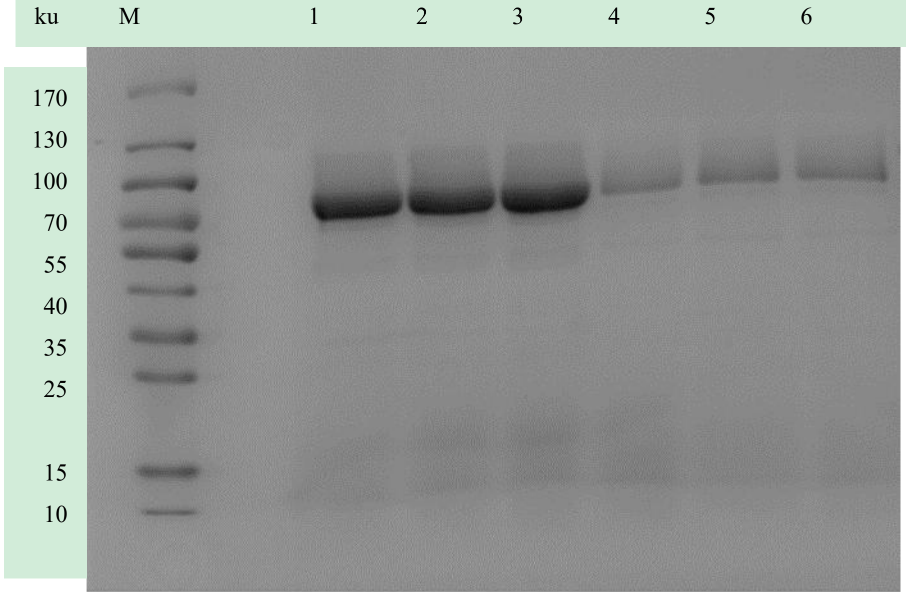
### 2.3　毕赤酵母工程菌株的摇瓶表达

将构建好的野生型和优化型α-半乳糖苷酶毕赤酵母工程菌株进行摇瓶发酵，结果见表 1。由表中数据可以发现，在发酵最初的 48 h，野生型和优化型工程菌株的α-半乳糖苷酶活性均快速提高，随后增速减缓。在摇瓶发酵全过程中，优化型工程菌株的α-半乳糖苷酶活性始终高于野生型工程菌株。诱导 120 h 后，优化型工程菌株的α-半乳糖苷酶活性比野生型工程菌株提高了 285%。野生型和优化型α-半乳糖苷酶毕赤酵母工程菌株摇瓶表达产物的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）图见图 4。将目的条带切下进行质谱鉴定，鉴定结果显示摇瓶发酵产物确为α-半乳糖苷酶。

表 1　重组菌株摇瓶发酵活力

Table 1　Catalytic activity of recombinant strains in shaking flask　　U/mL

| 菌株 Strains | 诱导时间 Induction time/h | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| X33/*gal A*-wt | 0.020 | 0.165 | 0.231 | 0.332 | 0.507 |
| X33/*gal* A-opt | 0.143 | 0.601 | 1.133 | 1.173 | 1.952 |




M：分子量标准；1~3：优化型工程菌株；4~6：野生型工程菌株。

M: Molecular weight marker; 1 to 3: optimized type engineered strains; 4 to 6: wild type

engineered strains.

图 4 α-半乳糖苷酶摇瓶诱导 120 h 发酵上清液 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE diagram of α-galactosidase induced 120 h in shaking flask

## 2.4 α-半乳糖苷酶的酶学性质分析

### 2.4.1 最适 pH 和 pH 稳定性

55 ℃条件下，测定α-半乳糖苷酶在 pH 2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00 和 8.00 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中的活性，结果显示，α-半乳糖苷酶活性最大值出现在 pH 3.00～5.00 间。因此，在 pH 3.00～5.00 间再设置梯度，55 ℃条件下再次测定α-半乳糖苷酶在 pH 2.00、3.00、3.33、3.66、4.00、4.33、4.66、5.00、6.00、7.00 和 8.00 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中的活性，结果显示，该酶的最适 pH 为 4.33，当 pH 在 3.33~5.00 间时可保持 60%以上的相对活性（图 5）。

室温下，将酶液在不同 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中预处理 30 min 后，在最适条件下测残余α-半乳糖苷酶活性，结果如图 6 所示，该酶在 pH 3.00~8.00 的条件下稳定性良好，在 pH 2.00 条件下处理 30 min 后，仍保持 60%的相对活性。

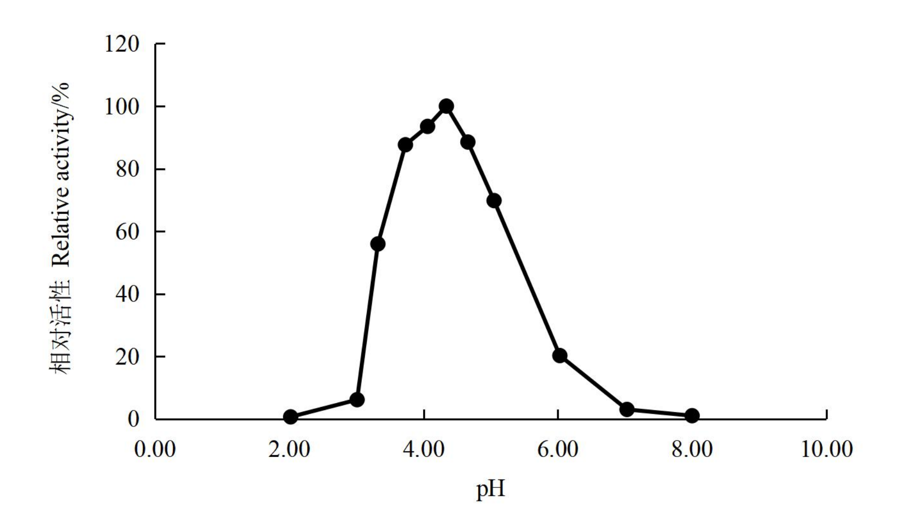



图 5 pH 对α-半乳糖苷酶活性的影响

Fig.5 Effects of pH on α-galactosidase activity

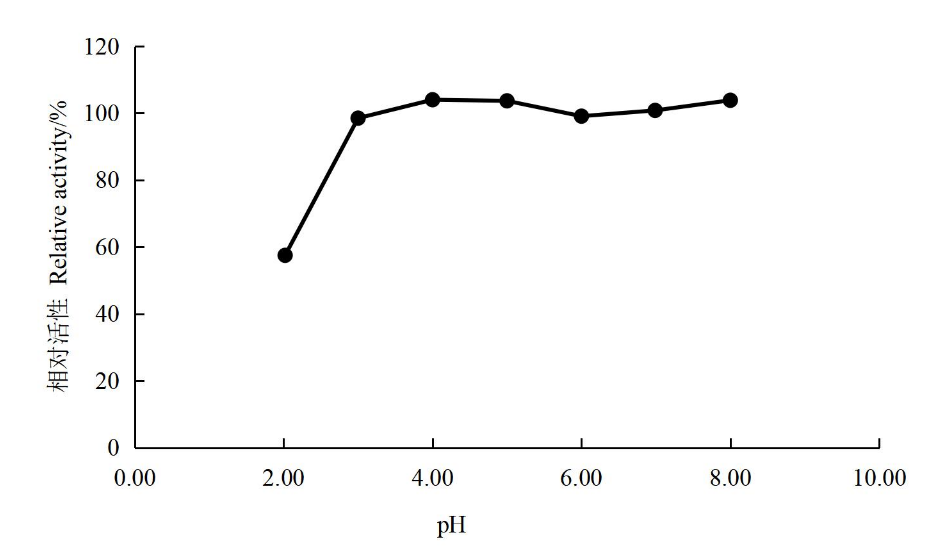



图 6 α-半乳糖苷酶活性的 pH 稳定性

Fig.6 pH stability of α-galactosidase activity

2.4.2 最适温度和温度稳定性

在 pH 4.33 的条件下，分别于 10、20、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 和 80 ℃的温度下测定α-半乳糖苷酶的活性，结果显示，α-半乳糖苷酶的最适温度为 55 ℃。当温度低于 55 ℃时，该酶的活性随温度的升高而逐渐增加；当温度超过 55 ℃时，该酶的活性则随温度的升高而下降。当温度在 40～60 ℃间时，该酶的相对活性可保持在 50%以上（图 7）。

图 8 显示的是α-半乳糖苷酶活性的温度稳定性，该酶在 40 和 45 ℃条件下预处理 100 min，活性几乎不变；在 50 ℃条件下预处理 50 min，活性几乎不变；在 55 ℃条件下预处理 50 min 后残余α-半乳糖苷酶的相对活性约为 50%；当温度超过 60 ℃时，短时间内α-半乳糖苷酶即可失活。

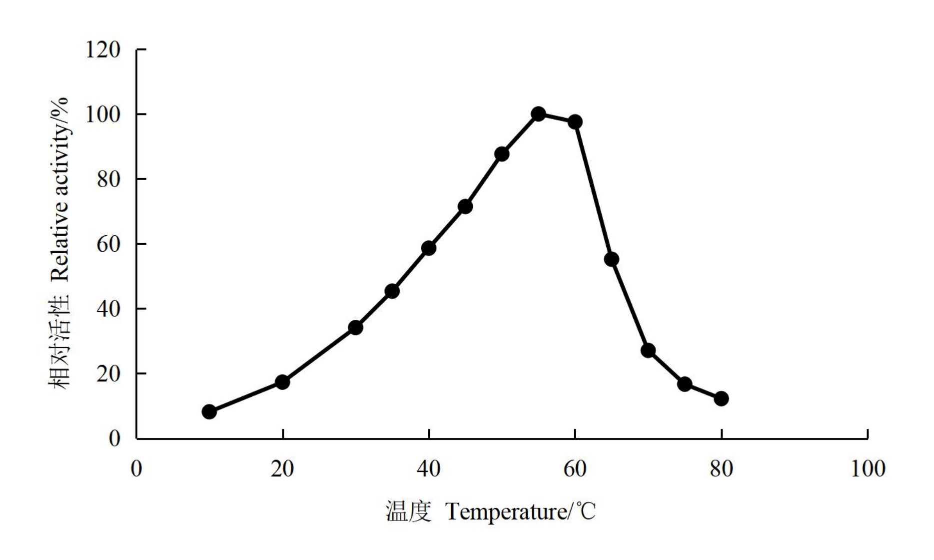



图 7 温度对α-半乳糖苷酶活性的影响

Fig.7 Effects of temperature on α-galactosidase activity

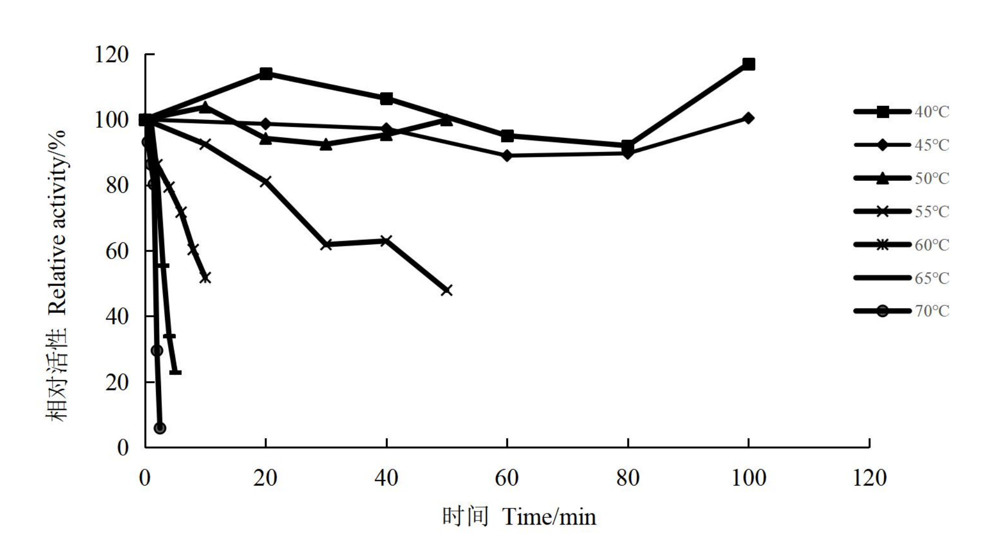



图 8 α-半乳糖苷酶活性的温度稳定性

Fig.8 Temperature stability of α-galactosidase activity

### 2.4.3 金属离子抗性

从表 2 数据可知，$MnSO_4$ 对α-半乳糖苷酶的活性有较强的抑制作用，而 KCl、$(NH_4)_2SO_4$ 和 $CuSO_4$ 则可提高α-半乳糖苷酶的活性。其他金属离子对α-半乳糖苷酶活性的影响不明显。

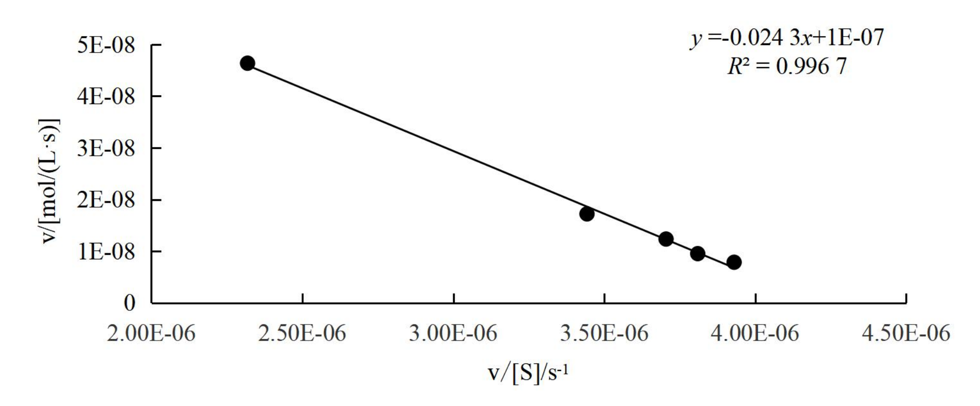
表 2 金属离子对α-半乳糖苷酶活性的影响

Table 2　Effects of metal ions on α-galactosidase activity　%

| 化学试剂 Chemical agents | 相对活性 Relative activity |
| --- | --- |
| 对照 Control | 100.00 |
| 硫酸铜 $CuSO_4$ | 122.23 |
| 氯化钾 KCl | 140.39 |
| 硫酸铵 $(NH_4)_2SO_4$ | 117.78 |
| 氯化镁 $MgCl_2$ | 107.92 |
| 氯化钙 $CaCl_2$ | 107.92 |
| 硫酸锌 $ZnSO_4$ | 105.80 |
| 氯化钠 NaCl | 104.25 |
| 硫酸钴 $CoSO_4$ | 98.84 |
| 硝酸钠 $NaNO_3$ | 97.10 |
| 硫酸锰 $MnSO_4$ | 77.39 |

### 2.4.4　酶动力学参数

以 *p*NPG 为底物，用 Eadie-Hofstee 作图法测定 $K_m$ 和 $V_{max}$，结果如图 9 所示。可知，该酶的 $K_m$ 为 0.024 3 mol/L，$V_{max}$ 为 $1.0\times10^{-7}$ mol/(L·s)。




v：平均反应速率[mol/(L·s)]；[S]：底物浓度（mol/L）。

v: mean reaction velocity [mol/(L·s)]; [S]: substrate concentration (mol/L).

图 9　Eadie-Hofstee 作图法

Fig.9　Eadie-Hofstee graphing method

## 2.5　α-半乳糖苷酶对豆浆中大豆寡糖的酶解效果

设置不同的温度和不同加酶量，验证α-半乳糖苷酶对豆浆中大豆寡糖的酶解效果。对酶解产物进行离子色谱分析，根据各组分的保留时间采用外标法对峰面积积分，得出各组分的含量。记录结果，分析并计算各处理条件下棉籽糖和水苏糖随酶解时间的增加其含量的变化。结果显示，在 25 ℃条件下，3 个加酶量处理下棉籽糖和水苏糖的含量均几乎不变，在 45 ℃条件下，3 个加酶量处理下中棉籽糖和水苏糖的含量有所减少，且加酶量大的处理减少的更多，反应 12 h 后，加酶量为 1.2 U 的处理棉籽糖降解率为 4.8%，水苏糖降解率为 8.0%，加酶量为 2.4 U 的处理棉籽糖降解率达到 50.0%，水苏糖降解率达到 31.9%。

# 3　讨　论

## 3.1　α-半乳糖苷酶基因序列的优化

毕赤酵母是一种常用的外源蛋白质表达系统，其对密码子具有偏好性，当序列中出现较多的稀有密码子时，表达效率可能表现出明显的降低，甚至导致翻译提前终止，蛋白质表达受阻。因此，研究中通常根据毕赤酵母使用密码子的偏好性，用常用的密码子替换稀有密码子，对基因序列进行优化，可以明显提高蛋白质的表达水平。Chang 等[30]根据毕赤酵母密码子偏好性对皱落假丝酵母脂肪酶基因序列进行了优化，结果表明优化后的脂肪酶蛋白质表达量为 152 mg/L，是野生型（33 mg/L）的 4.6 倍。在本试验中，根据毕赤酵母使用密码子的偏好性，以不改变氨基酸序列为前提，对去除信号肽的α-半乳糖苷酶基因序列进行优化，*gal A*-wt 与 *gal A*-opt 核苷酸序列的一致性为 76.68%。优化型和野生型α-半乳糖苷酶毕赤酵母工程菌株同时发酵 120 h，在发酵过程中优化型工程菌株的α-半乳糖苷酶活性高于野生型工程菌株，在发酵结束时优化型工程菌株的α-半乳糖苷酶活性比野生型工程菌株提高了 285%。

## 3.2　α-半乳糖苷酶的酶学性质分析

来源不同，α-半乳糖苷酶的酶学性质也各不相同。真菌来源的α-半乳糖苷酶最适 pH 通常在 4～6，最适温度一般在 40～70 ℃。Katrolia 等[31]对米黑根毛霉α-半乳糖苷酶基因进行克隆并在大肠杆菌中表达，结果显示，其α-半乳糖苷酶基因开放阅读框为 2 256 bp，编码 751 个氨基酸，最适 pH 和最适温度分别为 4.5 和 60 ℃。Rezessy-Szabó等[29]对疏棉状嗜热丝孢菌 CBS 396.62/b 中的α-半乳糖苷酶进行研究，显示该酶的最适 pH 为 5.0~5.5，最适温度为 65 ℃。本试验中，米曲霉来源的α-半乳糖苷酶在 pH 4.33 和温度 55 ℃条件下相对活性最大。在实际生产中，对酶的稳定性特别是温度稳定性要求较高，对酶热稳定性的研究也逐渐增多。Aulitto 等[6]报道的产耐热性α-半乳糖苷酶的菌株嗜热细菌 HB27 的最适温度为 90 ℃，在 70 ℃下 6 h 后残余α-半乳糖苷酶相对活性高达 90%，30 h 后仍可达 50%，在 90 ℃下保持 1 h 后残余α-半乳糖苷酶相对活性约为 50%。

本试验中研究的α-半乳糖苷酶具有较好的 pH 稳定性，在 pH 3.00～8.00 的条件下处理 30 min 活性几乎不变，在 pH 2.00 条件下处理 30 min 后，仍保持 60%的相对活性。温度稳定性方面，该酶在温度低于 55 ℃时稳定性较高，在 55 ℃条件下 50 min 后残余α-半乳糖苷酶相对活性为 50%，当温度为 60 ℃时，10 min 后α-半乳糖苷酶的活性损失接近 1/2，70 ℃条件下 5 min 后α-半乳糖苷酶即完全失活。此外，本试验得到的α-半乳糖苷酶对试验中的大部分金属离子的抗性较好，而 $MnSO_4$ 对α-半乳糖苷酶的活性有较强的抑制作用，KCl、$(NH_4)_2SO_4$ 和 $CuSO_4$ 则可提高α-半乳糖苷酶的活性。

### 3.3 α-半乳糖苷酶对豆浆中大豆寡糖的酶解效果

α-半乳糖苷酶酶解大豆寡糖属于消除大豆寡糖抗营养作用的生物学方法。Huang 等[32]将巨大芽孢杆菌来源的α-半乳糖苷酶在大肠杆菌中进行表达，其最适温度为 37 ℃，最适 pH 为 6.8，向 1 mL 豆浆中加入 1 U/mL 该酶或者该酶与胰蛋白酶的混合物，37 ℃条件下进行酶解，可有效降解豆浆中的棉籽糖和水苏糖，且α-半乳糖苷酶与胰蛋白酶同时存在时更利于大豆寡糖的降解，4 h 内即可完全降解豆浆中的棉籽糖和水苏糖。在本试验中，用发酵所得

的粗酶液超滤掉金属离子后进行豆浆中大豆寡糖的酶解，设置 2 个温度（25 和 45 ℃）和 3 个加酶量（0.6、1.2 和 2.4 U），对 10 mL 豆浆（调节 pH 为 5.00）进行酶解。较低温度（25 ℃）条件下豆浆中棉籽糖和水苏糖的含量几乎不变，较高温度（45 ℃）与最高加酶量（2.4 U）条件下酶解 12 h，棉籽糖和水苏糖的降解率分别为 50.0%和 31.9%。与其他大豆寡糖降解试验的结果相比，本试验中棉籽糖和水苏糖的降解效率低且降解效果差，造成这一现象的原因可能有：1）豆浆的 pH 为 6.30[33]，本试验中α-半乳糖苷酶的最适 pH 为 4.33，pH 稳定性表明该酶在 pH 3.00~8.00 的条件下室温处理 30 min 后保持大约 90%的相对活性，且 pH 为 5.00 时的稳定性好于 pH 为 6.00 时（相对活性分别为 103%和 99%），由于酶解反应持续时间长，为了让酶在反应过程中保持更好的稳定性，选择用 pH 4.33 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液调节豆浆 pH 为 5.00 后再加酶进行反应。已有的α-半乳糖苷酶酶解豆浆的研究中，或者选择酶的最适 pH 为反应条件[32]，或者直接向豆浆中加入酶液[33-34]，棉籽糖和水苏糖均被完全降解。本试验中选择的 pH 条件不合适，可能导致α-半乳糖苷酶的活性被抑制，无法发挥酶解作用。2）反应体系不合适。本试验中加酶量较低，需要降解的豆浆体系较多，反应过程中酶与底物接触不充分，导致酶解不充分。3）本试验中 25 ℃条件下棉籽糖和水苏糖几乎没有被降解，这可能是低温下α-半乳糖苷酶活性受到抑制，也可能与大豆中其他抗营养因子的抑制作用有关。

## 4 结 论

① 本试验克隆出了米曲霉来源α-半乳糖苷酶 *gal A* 基因序列，该基因全长 1 605 bp，不含内含子，编码 534 个氨基酸，含有 1 个 25 个氨基酸长度的信号肽；构建了野生型和优化型α-半乳糖苷酶毕赤酵母工程菌株，摇瓶发酵 120 h 后α-半乳糖苷酶活性分别为 0.507 和 1.952 U/mL，优化型工程菌株的α-半乳糖苷酶活性比野生型工程菌株提高了 285%。

② 本试验中生产的α-半乳糖苷酶的最适 pH 为 4.33，最适温度为 55 ℃，有较好的金属离子抗性，以 *p*NPG 为底物进行酶动力学参数的测定，该酶的 $K_m$ 为 0.024 3 mol/L，$V_{max}$ 为

$1.0\times10^{-7}$ mol/(L·s)。

③ 用本试验中生产的α-半乳糖苷酶进行豆浆中大豆寡糖的体外酶解试验，当温度为45 ℃、加酶量为2.4 U时，反应12 h后棉籽糖的降解率为50.0%，水苏糖的降解率为31.9%，降解效果较好，该α-半乳糖苷酶对降解大豆寡糖具有潜力。

参考文献：


[1] CHEN L Y,VADLANI P V,MADL R L.High-efficiency removal of phytic acid in soy meal using two-stage temperature-induced *Aspergillus oryzae* solid-state fermentation[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2014,94(1):113–118.

[2] EL-SHEMY H,ABDEL-RAHIM E,SHABAN O,et al.Comparison of nutritional and antinutritional factors in soybean and fababean seeds with or without cortex[J].Soil Science and Plant Nutrtion,2000,46(2):515–524.

[3] ZOU W,WANG M,YAO D,et al.Fluorescence and circular dichroism spectroscopy to understand the interactions between cyclodextrins and α-galactosidase from green coffee beans[J].Food Bioscience,2017,20:110–115.

[4] TSANIKLIDIS G,BENOVIAS A,DELIS C,et al.Acidic alpha galactosidase during the maturation and cold storage of cherry tomatoes[J].Acta Physiologiae Plantarum,2016,38(2):57.

[5] ZHA H G,FLOWERS V L,YANG M,et al.Acidic α-galactosidase is the most abundant nectarin in floral nectar of common tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J].Annals of Botany,2012,109(4):735–745.

[6] AULITTO M,FUSCO S,FIORENTINO G,et al.*Thermus thermophilus* as source of thermozymes for biotechnological applications:homologous expression and biochemical characterization of an α-galactosidase[J].Microbial Cell Factories,2017,16:28.

[7] XU H B,QIN Y J,HUANG Z Q,et al.Characterization and site-directed mutagenesis of an α-galactosidase from the deep-sea bacterium *Bacillus megaterium*[J].Enzyme and Microbial Technology,2014,56:46–52.

[8] LEE A,CHOI K H,YOON D,et al.Characterization of a thermostable glycoside hydrolase family 36 α-galactosidase from *Caldicellulosiruptor bescii*[J].Journal of Bioscience and Bioengineering,2017,124(3):289–295.

[9] GONG W,XU L,GU G F,et al.Efficient and regioselective synthesis of globotriose by a novel α-galactosidase from *Bacteroides fragilis*[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2016,100(15):6693–6702.

[10] GOLOTIN V A,BALABANOVA L A,NOSKOVA Y A,et al.Optimization of cold-adapted alpha-galactosidase expression in *Escherichia coli*[J].Protein Expression and Purification,2016,123:14–18.

[11] TEMUUJIN U,PARK J S,HONG S K.Molecular characterization of the α-galactosidase SCO0284 from *Streptomyces coelicolor* A3(2),a family 27 glycosyl hydrolase[J].Journal of Microbiology and Biotechnology,2016,26(9):1650–1656.

[12] MARUTA A,YAMANE M,MATSUBARA M,et al.A novel α-galactosidase from *Fusarium oxysporum* and its application in determining the structure of the gum arabic side chain[J].Enzyme and Microbial Technology,2017,103:25–33.

[13] HU Y J,ZHU M J,TIAN G T,et al.Isolation of a protease-resistant and pH-stable α-galactosidase displaying hydrolytic efficacy toward raffinose family oligosaccharides from the button mushroom *Agaricus bisporus*[J].International Journal of Biological Macromolecules,2017,104:576–583.

[14] 胡玉净.榆黄蘑、红平菇和双孢菇子实体中α-半乳糖苷酶理化性质的研究[D].博士学位

论文.北京:中国农业大学,2016:39–59.

[15] 莫海飞,陈炼红,黄林,等.响应面法优化里氏木霉固体发酵产α-半乳糖苷酶培养条件[J].中国畜牧兽医,2016,43(8):2038–2046.

[16] NELSON M P,BOUTIN M,TSE T E,et al.The lysosomal enzyme alpha-galactosidase A is deficient in Parkinson's disease brain in association with the pathologic accumulation of alpha-synuclein[J].Neurobiology of Disease,2018,110:68–81.

[17] Ü EYLER N,BIKO L,HOSE D,et al.Comprehensive and differential long-term characterization of the alpha-galactosidase A deficient mouse model of Fabry disease focusing on the sensory system and pain development[J].Molecular Pain,2016,12,doi：10.1177/1744806916646379.

[18] ALCALAY R N,WOLF P,LEVY O A,et al.Alpha galactosidase A activity in Parkinson's disease[J].Neurobiology of Disease,2018,112:85–90.

[19] 张波,王继强,张宝彤.α-半乳糖苷酶水解底物的特异性及其在保育猪日粮中的应用[J].中国饲料,2013(1):18–20.

[20] 许尧兴,许少春,李艳丽,等.在玉米-豆粕型日粮中添加α-半乳糖苷酶对生长猪生产性能的影响[J].饲料工业,2008,29(4):9–11.

[21] WANG C L,LU W Q,LI D F,et al.Effects of alpha-galactosidase supplementation to corn-soybean meal diets on nutrient utilization,performance,serum indices and organ weight in broilers[J].Asian-Australasian Journal of Animal Science,2005,18(12):1761–1768.

[22] 缪志军,王向荣,蒋桂韬,等.复合非淀粉多糖酶制剂中补充α-半乳糖苷酶对番鸭生产性能的影响[J].中国饲料,2010(12):17–19.

[23] 沈仁权,陈中孚,顾其敏,等.嗜热脂肪芽孢杆菌中一株对分解代谢物不敏感突变型的α-半乳糖苷酶的纯化及其性质[J].复旦学报(自然科学版）,1981,20(2):177–185.

[24] SHANKAR S K,MULIMANI V H.α-Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation[J].Bioresource Technology,2007,98(4):958–961.

[25] GAO X L,YIN Y Y,ZHOU C S.Purification,characterisation and salt-tolerance molecular mechanisms of aspartyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* 3.042[J].Food Chemistry,2018,240:377–385.

[26] KE Y,HUANG W Q,LI J Z,et al.Enzymatic characteristics of a recombinant neutral protease Ⅰ (rNp Ⅰ) from *Aspergillus oryzae* expressed in *Pichia pastoris*[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2012,60(49):12164–12169.

[27] LEE S K,HWANG J Y,CHOI S H,et al.Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste[J].Food Science and Biotechnology,2010,19(2):327–334.

[28] ZAAK H,SASSI M,FERNANDEZ-LAFUENTE R.A new heterofunctional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes:application to the stabilization of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J].Process Biochemistry,2018,64:200–205.

[29] REZESSY-SZAB J M,NGUYEN Q D,HOSCHKE A,et al.A novel thermostable α-galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b:purification and characterization[J].Biochimica et Biophysica Acta:General Subjects,2007,1770(1):55–62.

[30] CHANG S W,LEE G C,SHAW J F.Codon optimization of *Candida rugosa lip*1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54(3):815–822.

[31] KATROLIA P,JIA H Y,YAN Q J,et al.Characterization of a protease-resistant α-galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in

removal of raffinose family oligosaccharides[J].Bioresource Technology,2012,110:578–586.

[32] HUANG Y,ZHANG H,BEN P P,et al.Characterization of a novel GH36 α-galactosidase from *Bacillus megaterium* and its application in degradation of raffinose family oligosaccharides[J].International Journal of Biological Macromolecules,2018,108:98–104.

[33] KAPNOOR S,MULIMANI V H.Production of α-galactosidase by *Aspergillus oryzae* through solid-state fermentation and its application in soymilk galactooligosaccharide hydrolysis[J].Brazilian Archives of Biology and Technology,2010,53(1):211–218.

[34] VIANA S D F,GUIMAR ES V M,JOS I C,et al.Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α-galactosidase[J].Food Chemistry,2005,93(4):665–670.

# Expression of α-Galactosidase Gene *gal A* from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris* and Its Enzymolysis Effect on Soybean Oligosaccharides in Soymilk

GUO Yuhan YANG Yongzhi GUO Henan WANG Jian CAO Yunhe*

(*State Key Laboratory of Animal Nutrition*, *College of Animal Science and Technology*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100193, *China*)

Abstract: The aim of this experiment was to express the α-galactosidase gene *gal-A* from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris* and study its enzymolysis effect on soybean oligosaccharides in soymilk. The specific primers were designed on the basis of mRNA sequence published in NCBI database (GenBank accession number: XP_001817311.1), and were used in polymerase chain reaction (PCR) to obtain the sequence of *gal-A* gene. Codon sequence was optimized according to the codon bias of *Pichia pastoris*. Wild type and optimized type *Pichia pastoris* engineered strains were constructed, fermented in shaking flask for 120 h and the enzyme properties were determined. Ten mL soymilk were treated with different concentrations (0.6, 1.2 and 2.4 U) of α-galactosidase under different temperatures (25 and 45 ℃). The results showed that the full length of α-galactosidase gene *gal-A* was 1 605 bp without intron, coding 534 amino acids. After inducing 120 h, the α-galactosidase activity of optimized type engineered strain was 1.952 U/mL, which improved 285% compared with the wild type engineered strain. Optimal pH

*Corresponding author, associate professor, E-mail: caoyh@cau.edu.cn （责任编辑 菅景颖）

and temperature of this α-galactosidase was 4.33 and 55 ℃, respectively. The enzyme showed good pH stability at the range of pH 3.00 to 8.00. For temperature stability, after incubating 40 min in 55 ℃, the relative activity of residue α-galactosidase was 60%. The α-galactosidase showed resistance to most of metal ions detected, while was inhibited by $MnSO_4$. For enzyme kinetic characteristics, the Michaelis constant ($K_m$) and the maximum reaction velocity ($V_{max}$) of α-galactosidase using *p*NPG as substrate were 0.024 3 mol/L and $1.0\times10^{-7}$ mol/(L·s), respectively. Enzymatic hydrolysis results showed that soybean oligosaccharides were degraded under 45 ℃ with 2.4 U α-galactosidase, after 12 h, the degradation rate of raffinose and stachyose were 50.0% and 31.9%, respectively. These results indicate that α-galactosidase obtained in this experiment can degrade soybean oligosaccharides in soymilk to some extent.

Key words: *Aspergillus oryzae*; α-galactosidase; codon optimization; *Pichia pastoris*; soybean oligosaccharides